

**ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÙNG GEN TY THỂ COII-16S-RRNA
MỘT SỐ LOÀI TUYẾN TRÙNG SẴN RỄ *MELOIDOGYNE* SPP.
KÝ SINH CÂY CÀ PHÊ Ở TỈNH ĐẮK LẮK**

**Lê Thị Mai Linh^{1,2}, Nguyễn Thị Duyên^{1,2}
Phan Kế Long^{2,3}, Trịnh Quang Pháp^{1,2}**

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Tuyến trùng sần rễ *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* được ghi nhận gây hại nghiêm trọng nhất và ký sinh đa thực trên nhiều cây trồng trong đó có cây Cà phê (Perry et al., 2009). Hiện tại trên thế giới đã ghi nhận được 17 loài ký sinh trên cà phê (Souza, 2008). Tại Việt Nam, những công bố trước cho thấy chỉ có loài *M. incognita* ghi nhận nhiều nhất trên các vùng trồng cà phê và mới xuất hiện thêm 2 loài khác ký sinh cùng với loài *M. incognita* là *M. exigua*, *M. coffeicola* (Trinh et al., 2013).

Nhiều nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền tuyến trùng nói chung và tuyến trùng sần rễ nói riêng dựa trên các vùng gen nhân và gen ty thể được áp dụng rộng rãi trong những năm gần (Perry et al., 2009). Tuy nhiên, đối với nhóm loài tuyến trùng sần rễ, *M. incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria*, việc sử dụng vùng gen nhân (18S, ITS, 28S) có nhiều hạn chế do mức độ đa dạng di truyền thấp (Perry et al., 2009). Các nghiên cứu trên vùng gene ty thể (mtDNA) cũng có kết quả rất tốt cho việc phân tích phát sinh chủng loại của giống *Meloidogyne* (Holterman et al., 2009). Đặc biệt là đoạn gen ty thể nằm giữa COII-mtDNA và 16S-rRNA đã được sử dụng rất hiệu quả trong phân loại các loài *Meloidogyne* spp., nhất là một số loài có đa dạng di truyền thấp như: *M. enterolobii*, *M. incognita* và *M. javanica* (Powers & Harris, 1993; Blok et al., 2002). Những nghiên cứu về đa dạng di truyền hay phân loại của nhóm tuyến trùng sần rễ ở Việt Nam đã và đang được thực hiện cũng cho thấy một số vùng gen COI, ITS có độ đa dạng di truyền thấp với 3 loài *M. incognita*, *M. javanica* và *M. Arenaria*, nên khó có thể sử dụng trong phân loại (Lê Thị Mai Linh & cs., 2015).

Với sự quan trọng của nhóm loài tuyến trùng sần rễ nhiệt đới đối với cây trồng và đặc biệt đối với cà phê, việc nghiên cứu đánh giá các đặc tính di truyền để ứng dụng trong phân loại là rất hữu ích. Do vậy, nghiên cứu này chúng tôi cung cấp đa dạng di truyền vùng gen COII-16S-rRNA của 3 loài *M. incognita*, *M. javanica* và *M. arenaria* ký sinh cây cà phê ở Tây nguyên.

I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Tuyến trùng sần rễ *Meloidogyne* spp. được thu thập trên cây cà phê vối (*Coffea canephora*) tại huyện Cư M'gar- Tỉnh Đắk Lắk. Đặc điểm hình thái của 3 mẫu nghiên cứu (ký hiệu M4533, M4531, M4546), được phân loại tương ứng với loài *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*. Mẫu được lưu trữ trong dung dịch TAF và DESS tại phòng Tuyến trùng học (Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật).

Bảng 1 cho thấy các mẫu nghiên cứu có mức độ tương đồng với các loài *M. javanica*, *M. incognita*, *M. Arenaria* tham khảo rất cao. Quần thể loài *M. incognita* (M4533) có khoảng cách di truyền đối với loài *M. incognita* (KP001571.1; FJ159631.1) là 0.00, quần thể loài *M. arenaria* (M4546) tương đồng với *M. arenaria* (KX280643.1; JQ446377.1; KX983450.1) là 0.00 và quần thể loài *M. javanica* (M4531) tương đồng đối với *M. javanica* (KC287197.1; KC287196.1) là 0.00. Các quần thể của 3 loài *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* ở tương đồng với các loài *M. hapla*, *M. enterolobii*, *M. gramminicola*, *M. mali*, *M. partityla*, *M. marylandi*, *M. fallax* và *M. naasi* từ 0.17 - 0.49. Như vậy cho thấy ranh giới cách biệt của 3 loài *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* rất thấp từ 0.00 - 0.01.

Quần thể của cả 3 loài ở Việt Nam chỉ có 12 biến đổi nucleotide trên vùng gen COII-16S. Trong đó ở vị trí nucleotide thứ 126, 223, 287, 680, 682, 807 quần thể loài *M. incognita* có sự biến đổi so với 2 loài còn lại, quần thể loài *M. arenaria* có 2 vị trí biến đổi là vị trí 298 và 982 khác biệt so với 2 loài còn lại. Quần thể loài *M. javanica* có 2 biến đổi tại vị trí 529 và 807 so với 2 loài còn lại. Tuy nhiên trong cùng một loài lại không có sự biến đổi (sai khác 0- 1 nucleotide) (Bảng 2).

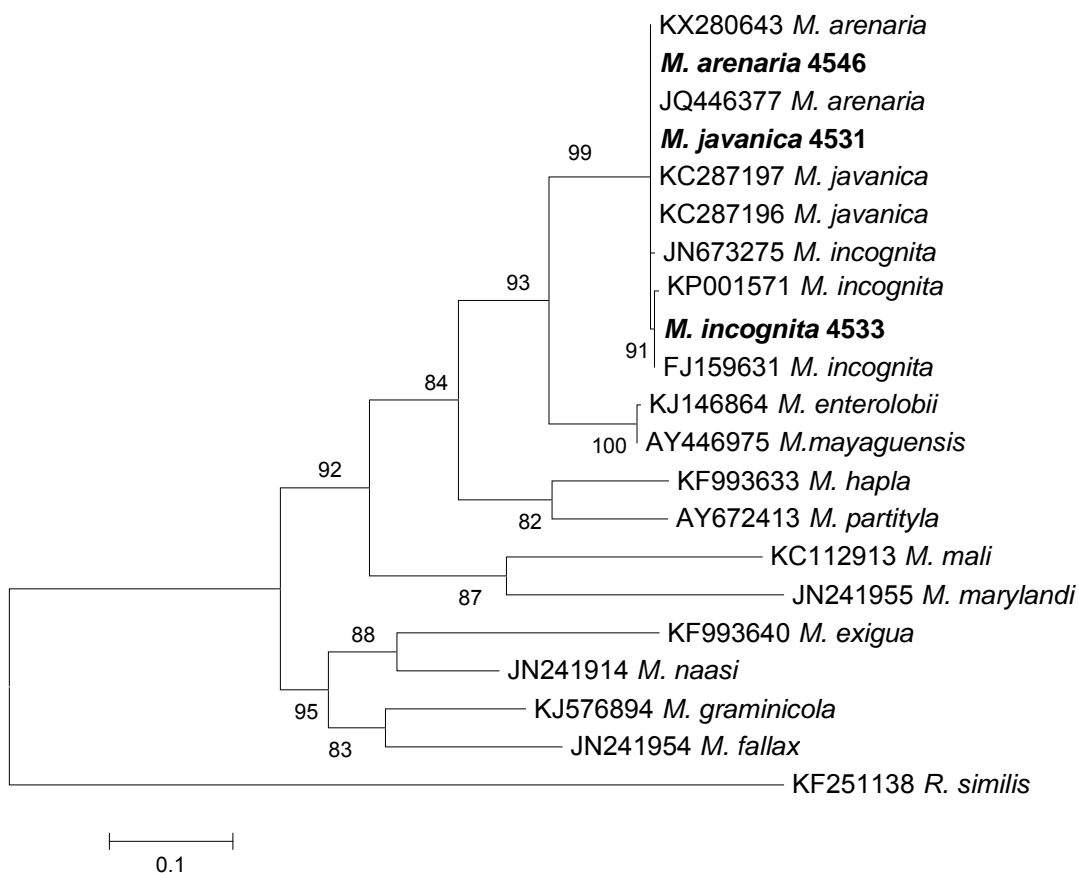
Bảng 2

Vị trí biến đổi nucleotide của các chủng *Meloidogyne* spp., nghiên cứu với loài gần gũi

Tên mẫu/ Loài	Vị trí biến đổi nucleotide											
	126	223	287	298	529	550	568	680	682	807	900	928
<i>Meloidogyne</i> sp. 4533	A	C	A	G	A	T	G	A	T	G	A	G
KP001571 <i>M. incognita</i>	A	C	A	G	A	T	G	A	T	G	G	G
FJ159631 <i>M. incognita</i>	A	C	A	G	A	T	G	A	T	G	G	G
<i>Meloidogyne</i> sp. 4546	G	T	G	A	A	G	A	G	G	-	G	A
KX280643 <i>M. arenaria</i>	G	T	G	A	A	T	G	G	G	-	G	A
JQ446377 <i>M. arenaria</i>	G	T	G	A	A	T	G	G	G	-	G	A
KX983450 <i>M. arenaria</i>	G	T	G	A	A	T	G	G	G	-	G	A
<i>Meloidogyne</i> sp. 4531	G	T	G	G	G	T	G	G	G	A	G	G
KC287197 <i>M. javanica</i>	G	T	G	G	G	T	G	G	G	A	G	G
KC287196 <i>M. javanica</i>	G	T	G	G	G	T	G	G	G	A	G	G

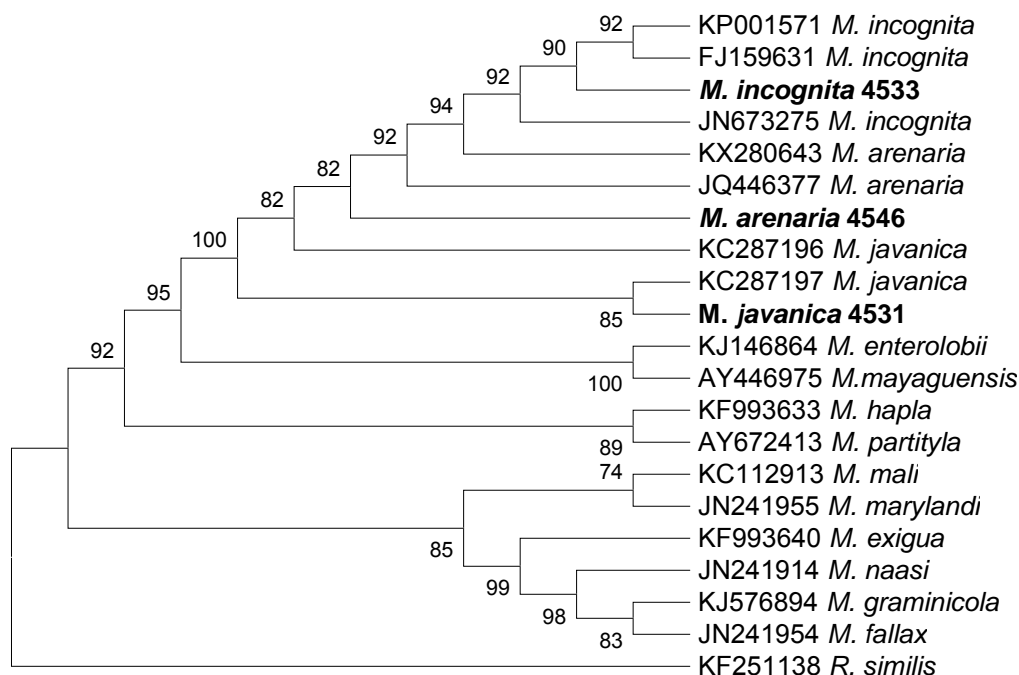
Cây phát sinh chủng loại giữa các loài trong giống *Meloidogyne*, sử dụng loài *Radopholus similis* làm loài tham chiếu ngoài, được xây dựng với thuật toán Maximumlikelihood (ML) và Maximum parsimony (MP) được xây dựng với thuật toán hoán vị nhánh là Subtree Pruning Regrafting (SPR), cho hai cây phát sinh chủng loại có độ tương đồng cao về dạng hình học và chiều dài các nhánh, phản ánh tính trung thực trong đánh giá mối quan hệ phát sinh chủng loại giữa các loài. Các giá trị bootstrap ở gốc nhánh từ 75 trở lên cho thấy kết quả này là chính xác và tin cậy (hình 1, hình 2).

Cây phát sinh chủng loại thể hiện rõ sự phân nhánh giữa 3 loài *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* so với các loài còn lại, tuy nhiên trong nhánh của 3 loài này thể hiện sự phân hóa nhỏ, khó có thể tách loài ở cây ML, sự phân hóa này thể hiện rõ hơn ở cây MP do phương pháp này yêu cầu dữ liệu đầu vào phải cân đối để mang đủ đặc điểm phát sinh nhóm cần thiết cho phân tích. Trong đó loài *M. arenaria* thể hiện sự phân hóa rõ nhất khi các chủng thuộc loài này tạo thành 1 nhánh riêng biệt ở cây MP. Qua sự phân nhánh ở cả 2 cây phát sinh chủng loại cho thấy các chủng *Meloidogyne* sp. 4533, *Meloidogyne* sp. 4546, *Meloidogyne* sp. 4531 cùng với các loài *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* có mức độ đa dạng di truyền thấp khó có thể sử dụng trong phân loại.



Hình 1: Cây phát sinh chủng loại của các quần thể/loài *Meloidogyne* spp. theo phương pháp Maximum Likelihood (HKY+G+I) giá trị bootstrap (%) thể hiện ở nhánh gốc

Các nghiên cứu trước đây cho rằng sử dụng vùng gen COII có thể đánh giá được mức độ đa dạng giữa các loài *Meloidogyne* cùng với vùng gen IGS và 28S-D2d3. Vùng gen ty thể COII được xem là vùng bảo thủ có thể sử dụng để phân biệt các loài *Meloidogyne* (Blouin, 2002; Tigano et al., 2005). Hơn thế nữa, vùng gen này chỉ ra rằng hầu hết các loài *Meloidogyne* từ nhiệt đới tạo thành một nhánh riêng biệt trong cây phát sinh chủng loại với giá trị Bootstrap lên tới 86%, trong khi đó các loài ôn đới được nhóm lại với bootstrap 93 (Onkendi & Moleleki., 2013). Đối với 3 loài *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* các nghiên cứu trước đây cho thấy rằng chúng có đa dạng di truyền rất thấp ở các vùng gen 18S, ITS, 28S và IGS (McClure et al., 2012; Deley et al., 2002; Adam et al., 2009; Carneiro et al., 2014; Block et al., 1997), do đó vùng gen này không thể phân biệt được các loài này. Vùng gen ty thể có mức độ tiến hóa nhanh hơn, tạo ra các biến đổi nucleotide đủ cho phân loại ở cấp độ loài (Block et al., 2009). Vùng gen COII-16S được sử dụng thành công trong phân loại các loài *Meloidogyne* gần gũi nhau (Powers et al., 2005). Các nghiên cứu trước ghi nhận được trình tự vùng gen COII-16S của loài *M. incognita* có chiều dài khoảng 1500bp và 1700bp, 1700 bp đối với loài *M. javanica*, 1100bp ở loài *M. arenaria* (Block et al., 2002; Powers and Harris, 1993). Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ ghi nhận được trình tự dài 950 bp của gen này của cả 3 loài, nên có thể chưa đủ để phân tích sự phân hóa của chúng, cần có thêm nghiên cứu ở vùng gen này.



Hình 2: Cây phát sinh chủng loại MP (Maximum parsimony). Giá trị bootstrap (%) với 1000 lần lấy lại mẫu thể hiện ở nhánh gốc

III. KẾT LUẬN

Đã xác định được đoạn ADN với chiều dài khoảng 950bp thuộc vùng gen COII-16S-rRNA của 3 quần thể tuyến trùng *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ký sinh cà phê ở Đắk Lắk. Đa dạng di truyền của đoạn trình tự này rất thấp, với khoảng cách di truyền từ 0.00-0.01 và có 12 biến đổi nucleotide trong đoạn gen này so với trình tự tương đồng của các loài trong nhóm này đã được công bố trong Genbank.

Lời cảm ơn: Bài báo được hoàn thành dưới sự trợ giúp kinh phí của đề tài cơ sở mã số IEBR.DT.04/17-18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blok V. C., Wishart J., Fargette M., Berthier K. & Phillips M. S., 2002. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology* 4, 773-781.
2. De Ley I. T., De Ley P., Vierstraete A., Karssen G., Moens M., Vanfleteren J., 2002. Phylogenetic analyses of *Meloidogyne* small subunit rDNA. *J Nematol* 34: 319-327.
3. Lê Thị Mai Linh., 2015. Phân tích mối quan hệ di truyền của một số loài tuyến trùng ký sinh gây sần rễ *Meloidogyne* spp. trên cây Hồ tiêu ở Quảng Trị. Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cán bộ trẻ 2015. Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.
4. McClure M. A., Nischwitz C., Skantar A. M., Schmitt M. E., Subbotin S. A., 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. *Plant Dis* 96: 635-647.

5. **Onkendi E. M., Moleleki L. N.,** 2013. Distribution and genetic diversity of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in potatoes from South Africa. *Plant Pathology* (2013) 62: 1184-1192
6. **Powers T. O., Harris T. S.,** 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25, 1-6.
7. **Powers T. O., Mullin P. G., Harris T. S., Sutton L. A., Higgins R. S.,** 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *J Nematol* 37: 226-235.
8. **Subbotin S. A., Vierstraete A., De Ley P., Rowe J., Waeyenberge L., Moens M. & Vanfleteren J. R.,** 2001. Phylogenetic relationships within the cystforming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(1): 1-16.
9. **Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S.,** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
10. **Trinh P. Q.,** 2013. Emerging *Meloidogyne* species threats to coffee and black pepper in the Western Highland in Vietnam. Emerging *Meloidogyne* species (root-knot nematodes) threats to coffee in the Western Highlands in Vietnam. In: *Proceedings of the 2nd VAST-KAST workshop on biodiversity and bio-active compounds*: 313-318.

**GENETIC DIVERSITY OF COII-16S-RRNA SEQUENCE OF SOME
MELOIDOGYNE SPP. SPECIES ON COFFEE IN DAK LAK**

**Le Thi Mai Linh, Nguyen Thi Duyen,
Phan Ke Long, Trinh Quang Phap**

SUMMARY

The genetic diversity of the three root knot nematodes species: *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* isolated on coffee growing provinces in Dak Lak- Tay Nguyen Highland was based on sequences of the cytochrome oxidase small subunit II (COII) and the 5' end region of the 16S-rRNA gene had length about 950bp but had low genetic diversity with genetic distances from 0.00-0.01 and 12 nucleotide mutations of various in the gene with other *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* species in this genbank.